



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0075370  
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 11월 29일  
Date of Application NOV 29, 2002

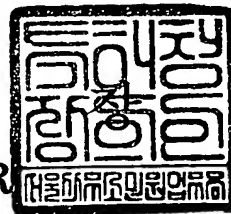
출원인 : (주)알바이오메드  
Applicant(s) ALBIOMED CO., LTD



2003    년    11    월    21    일

특    허    청

COMMISSIONER



|            |   |
|------------|---|
|            | 【서지사항】  |
| 【서류명】      | 명세서 등 보정서   |
| 【수신처】      | 특허청장  |
| 【제출일자】     | 2003.07.24  |
| 【제출인】      |   |
| 【명칭】       | ( 주 )알바이오메드   |
| 【출원인코드】    | 1-2002-026688-7   |
| 【사건과의 관계】  | 출원인   |
| 【대리인】      |   |
| 【성명】       | 정원기   |
| 【대리인코드】    | 9-1998-000534-2   |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-056025-5   |
| 【사건의 표시】   |   |
| 【출원번호】     | 10-2002-0075370   |
| 【출원일자】     | 2002.11.29  |
| 【심사청구일자】   | 2002.11.29  |
| 【발명의 명칭】   | 중합효소연쇄반응에 의한 다양한 유형의 인유두종바이러스를 검출하기 위한 신규한 피씨알 공통 프라이머와 그를 이용한 인 유두종바이러스를 검출하는 방법 |
| 【제출원인】     |   |
| 【접수번호】     | 1-1-2002-0397108-93   |
| 【접수일자】     | 2002.11.29  |
| 【보정할 서류】   | 명세서등  |
| 【보정할 사항】   |   |
| 【보정대상항목】   | 별지와 같음  |
| 【보정방법】     | 별지와 같음  |
| 【보정내용】     | 별지와 같음  |
| 【취지】       | 특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인<br>정원기 (인)                   |

【수수료】

【보정료】 0 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 0 원

【보정대상항목】 식별번호 17

【보정방법】 정정

【보정내용】

서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드로 구성되는 군 중에서 1조 이상 선택되는, 다양한 유형의 HPV의 DNA를 증폭시키는 합성된 프라이머를 제공한다.

【보정대상항목】 식별번호 18

【보정방법】 정정

【보정내용】

또한 본 발명은 상기한 프라이머를 사용하여 샘플 내의 다양한 유형의 HPV DNA를 증폭시키고 증폭 여부에 따라 샘플 내에 HPV 유형의 존재를 분석하는 방법을 제공한다.

【보정대상항목】 청구항 1

【보정방법】 정정

【보정내용】

서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 뉴클레오티드(제 1프라이머);

서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 뉴클레오티드(제 2프라이머);

서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드(제 3프라이머)로 구성되는 군 중에서 1조 이상 선택되는, 다양한 유형의 HPV의 DNA를 증폭하는 합성된 프라이머

【보정대상항목】 청구항 4

【보정방법】 정정

【보정내용】

서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 뉴클레오티드(제 1프라이머);

서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 뉴클레오티드(제 2프라이머);

서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드(제 3프라이머)로 구성되는 군 중에서 1조 이상 선택된 뉴클레오티드를 프라이머로 사용하고, 생물학적 샘플로부터 얻어진 핵산을 표적 DNA로 하는 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행함으로써 다양한 HPV의 DNA를 증폭하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 7

【보정방법】 정정

【보정내용】

서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 뉴클레오티드(제 1 프라이머);

서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 뉴클레오티드(제 2 프라이머);

서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드(제 3 프라이머)로 구성되는 군 중에서 선택된 1조 이상의 뉴클레오티드를 프라이머로 사용하고 생물학적 샘플로부터 얻어진 핵산을 표적 DNA로 하여 상기 표적 DNA를 증폭시키는 과정; 및

상기 증폭과정에서 증폭산물이 존재하는 경우 상기 샘플 내에 HPV 유형이 존재하는 것으로 판단하는 과정을 포함하는 다양한 HPV 유형의 존재를 분석하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 11

【보정방법】 정정

【보정내용】

서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 뉴클레오티드(제 1 프라이머);

서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 뉴클레오티드(제 2 프라이머);

서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드(제 3 프라이머)로 구성되는 군 중에서 1조 이상 선택되는 프라이머;

dNTP 혼합물(dATP, dCTP, dGTP, dTTP);

내열성 중합효소; 및

PCR 완충용액을 포함하는 다양한 HPV 유형을 검출하는 키트.

**【서지사항】**

**【서류명】** 명세서 등 보정서  
**【수신처】** 특허청장  
**【제출일자】** 2003.01.29  
**【제출인】**  
**【명칭】** (주)알바이오메드  
**【출원인코드】** 1-2002-026688-7  
**【사건과의 관계】** 출원인  
**【대리인】**  
**【성명】** 정원기  
**【대리인코드】** 9-1998-000534-2  
**【포괄위임등록번호】** 2002-056025-5  
**【사건의 표시】**  
**【출원번호】** 10-2002-0075370  
**【출원일자】** 2002.11.29  
**【심사청구일자】** 2002.11.29  
**【발명의 명칭】** 중합효소연쇄반응에 의한 다양한 유형의 인유두종바이러스를 검출하기 위한 신규한 피씨알 공통 프라이머와 그를 이용한 인 유두종바이러스를 검출하는 방법  
**【제출원인】**  
**【접수번호】** 1-1-02-0397108-93  
**【접수일자】** 2002.11.29  
**【보정할 서류】** 명세서등  
**【보정할 사항】**  
**【보정대상항목】** 별지와 같음  
**【보정방법】** 별지와 같음  
**【보정내용】** 별지와 같음  
**【취지】** 특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에 의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인  
 정원기 (인)

【수수료】

【보정료】 0 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 0 원



【보정대상항목】 식별번호 39

【보정방법】 정정

【보정내용】

상기 합성과정에서 합성한 3조의 프라이머를 사용하여 HPV 16과 HPV 18 감염 세포주인 CaSki(ATCC CRL-1550)와 HeLa(ATCC CCL-2), HPV 비감염 세포주인 K-562(KCLB-10243, Korean Cell Line Bank)를 대상으로 PCR 증폭시험을 수행하였다.

【보정대상항목】 식별번호 41

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 식별번호 42

【보정방법】 정정

【보정내용】

PCR 실험은 타카라(TakaRa)사로부터 구입한 10×buffer 2.5 $\mu$ l, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 3.75 $\mu$ l, 10 mM dNTP 0.5 $\mu$ l, Taq 중합효소 0.5 $\mu$ l (5unit)와 프라이머 1 $\mu$ l (50 pmoles), 증류수 5.2  $\mu$ l 주형 DNA 11.5 $\mu$ l로 구성된 반응액을 94℃에서 5분간 1회, 94℃ 1분-50℃ 1분-72℃ 1분의 49회 반복, 72℃에서 5분간 1회의 조건에서 처리하였으며, 최종 반응액 5 $\mu$ l를 DNA 사이즈 스탠더드 마커(size standard marker)와 함께 2% 아가로스 겔(agarose gel)에 부과하여 전기영동 하였다. 이때 전기영동 겔의 염색은 0.00005% 에티디움 브로마이드(ethidium bromide) 용액으로 행하였으며 겔의 각 경로

상에서 출현한 밴드의 유효 여부는 상기 표 1의 가상증폭 실험에서 얻어진 PCR 산물의 예상크기와 비교하여 판정하였다.

【보정대상항목】 식별번호 43

【보정방법】 정정

【보정내용】

도 1a, 도 1b, 도 1c는 각각 CaSki, HeLa, K-562를 대상으로 본 발명에서 합성된 3조의 프라이머를 사용하여 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진이다. 도면에서 M은 스탠더드 마커이고, 레인 1은 AlbioGP1 프라이머, 레인 2는 AlbioGP2 프라이머, 레인 3은 AlbioGP3 프라이머를 사용한 것을 나타내며, 측면의 숫자는 마커의 크기를 나타낸다. 도면에서 볼 수 있는 바와 같이 본 발명에서 합성된 상기 3조의 프라이머는 HPV 감염 세포주인 Caski(도 1a) 및 HeLa(도 1b)에 대해서는 하기 표 2에서 예측한 크기의 증폭이 일어났으나, 비감염 세포주인 K562(도 1c)에 대해서는 증폭이 일어나지 않았음을 알 수 있다.

실시예 2

본 실시예에서는 상기 실시예 1에서 확인한 3조의 프라이머를 사용하여 다양한 유형의 HPV 플라스미드 DNA를 함유하는 *E.coli* 균주를 대상으로 PCR을 수행하였다.

본 실시예에서 사용한 균주는 다음과 같다.

HPV-1a (ATCC 45021);

HPV-2a (ATCC 45022);

HPV-6b (ATCC 45150);

HPV-11 (ATCC 45151);

HPV-16 (ATCC 45113);

HPV-18 (ATCC 45152);

HPV-31 (ATCC 65446);

HPV-43 (ATCC 40338);

각 HPV 유형의 플라스미드 DNA를 함유하는 각 *E.coli* 균주는 37℃ LB 액체 배지에서 16시간 동안 진탕 배양한 다음 Qiafilter Plasmid Maxi Kit(Cat. No. 12263, QIAGEN 사)'로 분리 정제하여 10pg/ $\mu$ l로 농도 조정하였으며, 이들 역시 주형 DNA 용액으로 활용하였다. PCR 증폭은 상기 실시예 1에서와 동일한 반응물과 절차에 따라 각 주형 DNA에 대하여 구성 프라이머별로 독립적으로 수행하였다. 겔의 각 경로 상에서 출현한 밴드의 유효 여부는 HPV-16, HPV-18 HPV-31, HPV-43, HPV-2a, HPV-6b, HPV-11, HPV-1a DNA에 대한 각 프라이머의 컴퓨터 가상 증폭실험에서 얻어진 PCR 산물의 예상 크기(하기 표 2)와 비교하여 판정하였다.

【보정대상항목】 식별번호 49

【보정방법】 정정

【보정내용】

실시예 3 : 임상시료에 대한 선별된 공통 프라이머의 PCR 증폭 시험

【보정대상항목】 식별번호 50

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 실시예에서는 상기 실시예 1 및 실시예 2 에서 확인한 3조의 프라이머를 사용하여 임상적으로 HPV 유형의 DNA의 증폭여부에 따라 HPV 감염 여부는 물론 자궁경부암을 1차적으로 조기 검색할 수 있는 지를 확인하였다.

【보정대상항목】 식별번호 58

【보정방법】 정정

【보정내용】

상기 실시예 1 및 실시예 2 에서 확인된 3조의 프라이머와 이미 공개된 HPV 검출 프라이머인 MY09/MY11 프라이머 세트를 사용하여 피검자들로부터 얻은 DNA 샘플을 대상으로 PCR을 수행하고 전기영동을 실시하였다. 피검자들로부터의 DNA는 통상의 방법에 따라 수득하였으며, PCR 반응 조건은 상기 실시예 1과 동일한 절차에서 수행하였다. 본 발명의 프라이머는 비정상적인 환자(피검자 1 내지 20)로부터 얻은 DNA 샘플에 대해서만 증폭이 일어났으며 정상 환자(피검자 21 내지 30)로부터 얻은 DNA 샘플에

대해서는 증폭이 일어나지 않았다. 이는 자궁경부암 관련 환자 20명과 자궁경부암 비  
관련 환자 10명의 병인학적 추론과 일치한 것임을 알 수 있다.

## 【서지사항】

|            |  |
|------------|--|
| 【서류명】      | 특허출원서  |
| 【권리구분】     | 특허   |
| 【수신처】      | 특허청장   |
| 【제출일자】     | 2002.11.29   |
| 【발명의 명칭】   | 중합효소연쇄반응에 의한 다양한 유형의 인유두종바이러스를 검출하기 위한 신규한 피씨알 공통 프라이머와 그를 이용한 인유두종바이러스를 검출하는 방법               |
| 【발명의 영문명칭】 | Novel PCR General Primers and Method for Detecting Various Type of Human Papillomavirus by PCR |
| 【출원인】      |  |
| 【명칭】       | ( 주)알바이오메드   |
| 【출원인코드】    | 1-2002-026688-7  |
| 【대리인】      |  |
| 【성명】       | 정원기  |
| 【대리인코드】    | 9-1998-000534-2  |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-056025-5  |
| 【발명자】      |  |
| 【성명의 국문표기】 | 나광훈  |
| 【성명의 영문표기】 | NA,KWANG HUN   |
| 【주민등록번호】   | 720228-1535233   |
| 【우편번호】     | 156-032  |
| 【주소】       | 서울특별시 동작구 상도2동 22-82번지 202호  |
| 【국적】       | KR   |
| 【발명자】      |  |
| 【성명의 국문표기】 | 이상화  |
| 【성명의 영문표기】 | LEE,SANG HWA   |
| 【주민등록번호】   | 641202-1767719   |
| 【우편번호】     | 449-905  |
| 【주소】       | 경기도 용인시 기흥읍 상갈리 461 대우현대아파트 108-102  |
| 【국적】       | KR   |
| 【발명자】      |  |
| 【성명의 국문표기】 | 고정재  |
| 【성명의 영문표기】 | KO,JUNG JAE  |

|            |                                    |
|------------|------------------------------------|
| 【주민등록번호】   | 591014-1925116                     |
| 【우편번호】     | 449-912                            |
| 【주소】       | 경기도 용인시 구성면 마북리 621 쌍용아파트 107-1502 |
| 【국적】       | KR                                 |
| 【발명자】      |                                    |
| 【성명의 국문표기】 | 김승조                                |
| 【성명의 영문표기】 | KIM,SEUNG JO                       |
| 【주민등록번호】   | 341119-1068318                     |
| 【우편번호】     | 137-040                            |
| 【주소】       | 서울특별시 서초구 반포동 590-54 효성빌라 15-302   |
| 【국적】       | KR                                 |
| 【발명자】      |                                    |
| 【성명의 국문표기】 | 김인호                                |
| 【성명의 영문표기】 | KIM, IN HO                         |
| 【주민등록번호】   | 670122-1273515                     |
| 【우편번호】     | 132-888                            |
| 【주소】       | 서울특별시 도봉구 쌍문1동 490-17 현대빌라 301호    |
| 【국적】       | KR                                 |
| 【발명자】      |                                    |
| 【성명의 국문표기】 | 안희정                                |
| 【성명의 영문표기】 | AN,HEE JUNG                        |
| 【주민등록번호】   | 610107-2037425                     |
| 【우편번호】     | 463-901                            |
| 【주소】       | 경기도 성남시 분당구 이매동 삼성아파트 1013-602     |
| 【국적】       | KR                                 |
| 【발명자】      |                                    |
| 【성명의 국문표기】 | 차광렬                                |
| 【성명의 영문표기】 | CHA,KWANG YUL                      |
| 【주민등록번호】   | 521223-1005712                     |
| 【우편번호】     | 135-270                            |
| 【주소】       | 서울특별시 강남구 도곡동 193-1 힐데스하임빌라 702호   |
| 【국적】       | KR                                 |
| 【심사청구】     | 청구                                 |

**【핵산염기 및 아미노산 서열목록】****【서열개수】** 6**【서열목록의 전자파일】** 첨부

**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 정원기 (인)

**【수수료】****【기본출원료】** 20 면 29,000 원**【가산출원료】** 20 면 20,000 원**【우선권주장료】** 0 건 0 원**【심사청구료】** 13 항 525,000 원**【합계】** 574,000 원**【감면사유】** 소기업 (70%감면)**【감면후 수수료】** 172,200 원**【첨부서류】** 1. 요약서·명세서(도면)\_1통 2. 소기업임을 증명하는 서류\_1통



**【요약서】****【요약】**

본 발명은 인유두종바이러스(Human Papillomavirus, HPV)의 특정 염기서열의 DNA 단편을 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 통하여 다양한 HPV 유형(genotype)을 검출하기 위한 신규한 PCR 공통 프라이머와 그를 이용한 다양한 HPV 유형의 감염여부를 검출할 수 있는 방법에 관한 것으로, 다양한 유형의 HPV 핵산을 증폭 또는 검출할 수 있는 합성된 올리고 뉴클레오티드 서열을 제공하고 그와 같이 합성된 올리고 뉴클레오티드를 프라이머로 이용하여 1회의 PCR을 통하여 다양한 HPV 유형의 존재를 검출하는 방법을 개시하고 있다.

**【대표도】**

도 1a

**【색인어】**

인유두종바이러스(Human Papillomavirus, HPV), PCR 공통 프라이머(PCR General Primer), 프라이머(Primer), 자궁경부암(Cervical Cancer), 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)

**【명세서】****【발명의 명칭】**

중합효소연쇄반응에 의한 다양한 유형의 인유두종바이러스를 검출하기 위한 신규한 피씨알 공통 프라이머와 그를 이용한 인유두종바이러스를 검출하는 방법{Novel PCR General Primers and Method for Detecting Various Type of Human Papillomavirus by PCR}

**【도면의 간단한 설명】**

도 1a 내지 도 1c는 각각 HPV-16의 감염세포주인 CaSki, HPV-18의 감염세포주인 HeLa, HPV 비감염 세포주인 K-562를 표적 DNA로 하여 본 발명에서 합성한 프라이머를 사용하여 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진이다.

도 2a 내지 도 2c는 본 발명에서 합성한 3조의 프라이머와 다양한 HPV DNA를 대상으로 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진이다.

도 3a 내지 도 3t는 본 발명에서 합성한 3조의 프라이머와 종래의 HPV DNA증폭 프라이머를 사용하여 자궁경부암과 관련된 것으로 진단된 인체에서 수득한 DNA를 대상으로 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진이다.

도 4a 내지 도 4j는 본 발명에서 합성한 3조의 프라이머와 종래의 HPV DNA증폭 프라이머를 사용하여 자궁경부암과 관련 없는 것으로 진단된 인체에서 수득한 DNA를 대상으로 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진이다.

**【발명의 상세한 설명】****【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <5> 본 발명은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, 이하 "PCR"이라 한다)을 통하여 다양한 인유두종바이러스(Human Papilloma Virus, 이하 "HPV"이라 한다.) 유형(genotype)을 검출하기 위한 프라이머와 이를 이용한 검출방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 다양한 유형의 HPV DNA와 상보적으로 결합함으로써 PCR 과정을 통하여 증폭될 수 있는 공통 프라이머와 상기 프라이머를 이용한 종양원성 HPV의 감염여부를 진단하는 방법에 관한 것이다.
- <6> 자궁경부암은 WHO 통계에 따르면 전 세계적으로 매년 약 45만 명의 새로운 환자가 발생되며, 이는 발생 빈도상 여성암 중 유방암 다음으로 많으며, 개발도상국에서는 가장 흔한 여성암으로 연간 약 30만 명이 자궁경부암으로 사망한다. 보건복지부 한국중양암등록 사업(2000. 1. - 2000. 12) 연례 보고서를 보면 여성의 경우 자궁경부암(10.6%)은 3803건으로 10대 암의 장기별 발생 빈도상 위암(15.8%) 유방암(15.1%)에 이어 3위를 차지하고 있으며 특히 최근엔 20-30대 젊은 환자가 크게 늘어 전체 환자의 32%를 차지하는 등 국민보건상 중대한 문제가 되고 있다.
- <7> 현재 자궁경부암의 발병원인은 성접촉으로 감염되는 HPV(약 8kb의 이중쇄 환상 DNA 바이러스)가 가장 중요한 인자이며, 이러한 HPV는 상피세포에 감염하여 종양원성 단백질 E6와 E7을 만들고 이들은 각각 숙주세포의 종양억제 단백질인 p53과 pRb와 결합하여 이들 종양억제 단백질의 기능을 폐기함으로써, 결과적으로 감염 세포의 형질전환에 따른 종양형성으로 발전하는 것으로 규명되고 있다.

- <8> 현재까지 HPV는 120 가지 이상의 다른 유형이 발견되었고, 그 중에서 HPV-2, -3, -6, -7, -10, -11, -13, -16, -18, -26, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -39, -40, -42, -43, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -57, -58, -59, -61, -66, -67, -68, -69, -70, -73 유형이 자궁경부암의 중요한 발병원인 바이러스로 알려져 있다. 최근 들어 이러한 HPV 유형을 포함하여 그 외 다수의 HPV 유형의 감염 여부를 검출함에 있어서 특정 염기서열의 DNA 단편을 신속하고 간단하게 증폭시킬 수 있는 PCR 기법을 적용. 지금까지 밝혀진 거의 모든 HPV를 포괄적으로 검출하고자 하는 노력이 활발하게 시도되고 있다.
- <9> PCR 기법은 목적 병원체의 핵산 염기서열에 특이적으로 결합하는 상보적 핵산(올리고머 프라이머)을 가하여 온도에 따른 변성(denaturation), 재결합(annealing), 중합(polymerization) 과정을 반복하여 미량의 병원체 핵산을 증폭시켜 그 존재 여부를 검출할 수 있는 기술로서(미합중국 특허 제 4683195호 및 제 4683202호), HPV 감염 여부를 진단하기 위하여 쓰이는 대표적인 기술중 하나이다. 현재 검출 감도와 신뢰도 그리고 경제적인 측면에서 여타 기술에 비해 상대적 우수성을 인정받고 있으며 점차 그 사용의 빈도와 필요성이 증가하고 있다. 그러나 아직까지 HPV 감염 여부를 광범위하게 1차적으로 검색하기에 적합한 공통 프라이머(General Primer)가 부재하여 이의 적극적인 임상적 적용에는 많은 어려움이 있는 게 실정이다.
- <10> 현재 전 세계적으로 임상에서 쓰이고 있는 대표적 공통 프라이머로는 크게 북아메리카와 남아메리카 그리고 아시아에서 주로 쓰이고 있는 MY09/MY11 프라이머 세트와 유럽지역에서 주로 쓰이는 GP5+/GP6+ 프라이머 세트 그리고 SPF1/SPF2 프라이머 세트로 구분할 수 있다. 그 외에 최근에 새롭게 개발되어 쓰이고 있는 FAP59/FAP64와 PGMY09/PGMY11 등과 같은 프라이머 세트가 있으며 일부 연구 목적으로 쓰이는 수많은 공통 프라이머 세트도 있으나, 현존하는 다수

의 HPV 유형 수에 비하면 극히 제한된 수의 유형 검출에만 국한되고 있으며 HPV 유형에 따라 민감도가 떨어지는 등 여러 가지 문제점으로 인하여, 본래 공통 프라이머가 지니고 있는 가치와 필요성이 있음에도 불구하고 실제 임상 목적에서의 그 활용에 제약을 받고 있는 게 현실이다.

- <11> 따라서, 종래 사용되고 있는 공통 프라이머에 비하여 보다 다양한 종양원성 HPV를 증폭 및 검출할 수 있고 HPV 유형에 따른 민감도를 개선시킬 공통 프라이머 개발의 필요성이 제기되고 있다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <12> 본 발명은 PCR 기법에 의한 HPV 검출방법에 있어서 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 PCR 과정에 의하여 보다 많은 유형의 HPV를 포괄적으로 증폭할 수 있는 신규한 뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- <13> 본 발명의 다른 목적은 상기한 뉴클레오티드를 사용하여 HPV DNA를 증폭시키고 증폭 여부에 따라 HPV의 존재를 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

#### 【발명의 구성 및 작용】

- <14> 본 발명은 상기한 목적을 달성하기 위하여, 다양한 유형으로 구분되는 HPV의 DNA를 포괄적으로 동시에 검출할 수 있는 뉴클레오티드로 구성되는 신규한 프라이머를 제공한다.
- <15> 본 발명은 서열번호 1과 서열번호 2번으로 구성되는 뉴클레오티드;
- <16> 서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 뉴클레오티드;

- <17> 서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드로 구성되는 다양한 HPV의 DNA를 증폭시키는 합성된 프라이머를 제공한다.
- <18> 또한 본 발명은 상기한 프라이머를 사용하여 샘플 내의 HPV DNA를 증폭시키고 증폭 여부에 따라 샘플 내에 HPV의 존재를 분석하는 방법을 제공한다.
- <19> 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- <20> 종래의 PCR법에 의한 여러 유형의 HPV와 혼성화 할 수 있는 공통적인 올리고 뉴클레오티드 프라이머는 현존하는 HPV 유형의 수에 비해 검출할 수 있는 유형의 수가 적고 HPV 유형에 따라서 민감도가 크게 떨어진다. 그러나 본 발명에서는 종전의 PCR 공통 프라이머보다 많은 HPV 유형과 혼성화 할 수 있는 프라이머를 설계하고, 상기 프라이머에 의한 1회의 PCR을 수행하여 다양한 HPV 유형을 검출할 수 있도록 하였다.
- <21> 이를 위하여 본 발명에서는 총 72가지 HPV 유형의 전 서열을 기준으로 컴퓨터 프로그램을 이용하여 대표적인 PCR 공통 프라이머를 설계하였다. 상기 설계된 프라이머는 다른 컴퓨터 프로그램을 사용하여 다양한 HPV 유형에 대한 증폭도를 확인하고 그 중 최종적으로 3조의 프라이머를 선별하였다.
- <22> 상기에서 선별된 프라이머는 핵산자동합성기(Expedite™ 8909 합성기, ABI 사)를 사용하여 합성되었다. 이와 같이 합성된 프라이머는 먼저 대표적인 HPV 감염세포주의 DNA를 표적 DNA로 하여 PCR을 실시하여 HPV를 증폭시키는 것을 확인하였다.
- <23> 또한, 상기 프라이머를 사용하여 다양한 유형의 HPV 플라스미드(plasmid) DNA의 PCR 증폭여부를 실시해 본 결과 모두 이에 상응하는 DNA를 증폭시킨다는 사실을 확인하였다.

<24> 더욱이 본 발명에서 확인된 프라이머를 사용하여 인체에서 수득한 샘플을 대상으로 PCR 증폭을 수행하여 증폭 여부에 따라 HPV의 감염 여부를 조기에 진단할 수 있다. 본 발명에서는 질확대경진(colposcopy) 등의 임상 병리 검진을 통하여 비정상적으로 판정된 환자 20명과 정상으로 판정된 환자 10명을 대상으로 일부 환자에 대해서는 하이브리드 캡처 II법(hybrid capture II, digene 사)과, DNA칩 검사법(biomedlab 사)을 수행하였다. 마지막으로 본 발명에서 확인된 3조의 공통 프라이머와 기존에 알려진 대표적인 공통 프라이머인 MY09/MY11를 사용하여 PCR 시험을 수행하였다. 본 발명에서 확인된 공통 프라이머에 의한 증폭 여부를 수행하면 상기 세 포학적 검진법과 하이브리드 캡처 II법 및 DNA칩에 의한 진단법과 동일한 결과를 얻을 수 있었고 정확한 HPV DNA의 감염여부 및 조기 진단이 가능함을 확인하였다.

<25> 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 자세하게 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 상세히 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

#### <26> 실시예 1

<27> 본 실시예에서는 컴퓨터 시뮬레이션을 통하여 확인한 3조의 프라이머를 합성하여 HPV-16 감염세포주인 Caski(ATCC CRL-1550)와 HPV-18 감염세포주인 HeLa(ATCC CCL-2), HPV 비감염 세포주인 K-562 (KCLB-10243, Korean Cell Line Bank), 그리고 HPV-16 (ATCC 45113), HPV-18 (ATCC 45152), HPV-31 (ATCC 65446), HPV-43(ATCC 40338), HPV-2a (ATCC 45022), HPV-6b (ATCC 45150), HPV-11 (ATCC 45151), HPV-1a (ATCC 45021) 등 각 HPV 유형의 플라스미드 DNA를 대상으로 PCR 증폭시험을 수행하였다.

<28> (1) PCR 프라이머의 설계

<29> 본 발명의 목적인 다양한 HPV DNA와 상보적으로 결합하여 상기 HPV DNA를 포괄적으로 증폭시킬 수 있는 PCR 공통 프라이머로서의 뉴클레오티드를 설계하였다.

<30> 우선, 미국 NCBI(National Center for Biotechnology Information)와 미국립 로스 알라모스 HPV 데이터베이스로부터 HPV-1a, -2a, -3, -4, -5, -6b, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -15, -16, -16r, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -35h, -36, -37, -38, -39, -40, -41, -42, -44, -45, -47, -48, -49, -50, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -57, -58, -59, -60, -61, -63, -65, -66, -67, -68, -70, -72, -73, -75, -76, -77, -80 의 총 72가지 HPV 유형의 전 DNA 염기서열을 확보하였다. 확보한 DNA 서열을 컴퓨터 프로그램 'DNASTAR(MegAlign™ 5, DNASTAR Inc.)'를 활용하여 ClustalW 방법으로 쌍정렬(pairwise alignment) 및 다중서열정렬(multiple sequence alignment)을 실행한 후 계통발생도(Phylogenetic tree)를 작성하고 각 그룹을 대표하는 유형의 염기서열을 선별한 다음, 다시 컴퓨터 프로그램 프라이머 프리미어 5(primer premier 5, PREMIER Biosoft International Co.)를 활용하여 PCR 공통 프라이머를 설계하였다. 이때 프라이머의 길이는 27bp 및 31bp의 올리고 뉴클레오티드로 설정하였으며 PCR 산물의 크기는 200 ~ 500bp로 제한하여 30조의 PCR 공통 프라이머를 설계하였다.

<31> (2) 설계한 PCR 프라이머의 가상 증폭 및 프라이머의 선별

<32> 상기 과정에서 설계한 총 30조의 프라이머를 대상으로 다른 컴퓨터 프로그램(Amplify 1.2, University of Wisconsin)을 사용하여 각각 증폭도를 확인하였다. 설계 과정에서 이미 확



보한 총 72가지의 다른 HPV 유형을 대상으로 가상 증폭실험을 수행하였다. 본 실시예에서는 자궁경부암과 관련된 HPV-2a, -3, -6b, -7, -10, -11, -13, -16, -18, -26, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -39, -40, -42, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -57, -58, -59, -61, -66, -67, -68, -70, -73의 36종 HPV 유형을 증폭할 수 있는 것을 우선순위를 두고 선택하고 이 외의 HPV 유형도 다수 증폭하는 공통 프라이머 3조를 최종 선별하여 이를 AlbioGP1, AlbioGP2, AlbioGP3로 각각 명명하였으며, 프라이머에 따른 서열번호, 증폭유형, 증폭 산물의 크기, 증폭 위치를 예측하였으며, 이에 대한 결과는 하기 표 1에 표시하였다.

<33> 표 1. 다양한 유형의 HPV DNA의 포괄적 증폭을 위해 선별한 공통 프라이머

| <34> 프라이머 | 서열번호             | 프라이머<br>염기 특성 | 증폭 HPV 유형   | 증폭산물 크<br>기(bp) | 증폭 위치<br>(HPV 16) |
|-----------|------------------|---------------|---|-----------------|-------------------|
| AlbioGP1  | 서열번호 1<br>서열번호 2 | Unwobble      | 1a, 2a, 3, 4, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 16r, 18, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 77         | 252 ~ 347       | 6226 ~ 6548       |
| AlbioGP2  | 서열번호 3<br>서열번호 4 | Unwobble      | 1a, 2a, 3, 4, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 16r, 18, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 77 | 306 ~ 339       | 6229 ~ 6543       |
| AlbioGP3  | 서열번호 5<br>서열번호 6 | Unwobble      | 2a, 3, 6b, 10, 11, 13, 16, 16r, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 63, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 75, 76, 77   | 210 ~ 242       | 6547 ~ 6762       |

<35>       상기 표 1의 서열번호 중 홀수의 서열번호는 정방향 프라이머(forward primer)로 사용되며 짝수의 서열번호는 역방향 프라이머(reverse primer)로 사용된다.

<36> (3) 선별된 PCR 공통 프라이머의 합성

<37>       상기 과정에서 선별된 AlbioGP1, AlbioGP2, AlbioGP3 3조의 프라이머를 합성하였다. 상기 프라이머는 올리고 뉴클레오티드 포스포르아미다이트 합성화학에 근거한 고체상 합성기법을 탑재하고 있는 Expedite™ 8909 핵산 합성기(ABI 사)를 이용하여 합성하였다. 우선, 합성반응은 올리고뉴클레오티드 3' 말단에 위치한 뉴클레오사이드를 고정시킨 CPG 컬럼에서 수행하였으며, 기본적으로 디트리틸레이션(detritylation), 커플링(coupling), 캡핑(capping), 산화(oxidation) 반응을 반복주기로 하여 선별된 PCR 프라이머의 올리고뉴클레오티드 중합반응을 행하였다. 합성 종료 후 30% 암모니아수를 CPG 컬럼에 가하여 상기 올리고머를 격리시킨 다음 55℃에서 12시간 이상 탈보호(deprotection)시켜 고속진공(Speed Vac.)으로 농축 건조하였으며 다시 역상액체크로마토그래피 및 음이온교환 크로마토그래피를 행하여 순수 정제하였다. 최종 정제된 올리고머는 260nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

<38> (4) 합성된 PCR 공통 프라이머에 의한 PCR 증폭 시험

<39>       상기 합성과정에서 합성한 3조의 프라이머를 사용하여 HPV 16과 HPV 18 감염 세포주인 CaSki(ATCC CRL-1550)와 HeLa(ATCC CCL-2), HPV 비감염 세포주인 K-562 (KCLB-10243, Korean Cell Line Bank), 그리고 HPV-16 (ATCC 45113), HPV-18 (ATCC 45152), HPV-31 (ATCC 65446), HPV-43(ATCC 40338), HPV-2a (ATCC 45022), HPV-6b (ATCC 45150), HPV-11 (ATCC 45151),

HPV-1a (ATCC 45021) 등의 각 HPV 유형의 플라스미드 DNA를 함유하는 각 *E. coli* 균주를 대상으로 PCR 증폭 시험을 수행하였다.

<40> 우선 CaSki와 HeLa는 제조사의 지시에 따라 배양한 다음 0.25% 트립신 용액을 가하여 배양 플라스크로부터 탈락시켜 원심 채집하였으며, K-562 역시 제조사의 지시에 따라 배양한 다음 이들을 Dulbecco's phosphate-buffered saline (Gibco 사)로 한번 세척한 후 현미경상에서 그 세포수를 계측한 다음  $2 \times 10^4$  세포를 증류수  $230 \mu\text{l}$ 에 현탁하고  $100^\circ\text{C}$ 에서 15분간 가열하여 세포 DNA를 추출하였다. 이들은 최종적으로 실온에서 완전히 식힌 다음 12000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 그 상등액을 취하여 주형 DNA 용액으로 활용하였다.

<41> 또한, 각 HPV 유형의 플라스미드 DNA를 함유하는 각 *E. coli* 균주는  $37^\circ\text{C}$  LB 액체배지에서 16시간 동안 진탕 배양한 다음 'Qiafilter Plasmid Maxi Kit(Cat. No. 12263, QIAGEN 사)'로 분리 정제하여  $10\text{pg}/\mu\text{l}$ 로 농도 조정하였으며, 이들 역시 주형 DNA 용액으로 활용하였다.

<42> PCR 실험은 타카라(TakaRa)사로부터 구입한  $10 \times$ buffer  $2.5 \mu\text{l}$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$   $3.75 \mu\text{l}$ , 10 mM dNTP  $0.5 \mu\text{l}$ , Taq 중합효소  $0.5 \mu\text{l}$  (5unit)와 프라이머  $1 \mu\text{l}$  (50 pmoles), 증류수  $5.2 \mu\text{l}$  주형 DNA  $11.5 \mu\text{l}$ 로 구성된 반응액을  $94^\circ\text{C}$ 에서 5분간 1회,  $94^\circ\text{C}$  1분- $50^\circ\text{C}$  1분- $72^\circ\text{C}$  1분의 49회 반복,  $72^\circ\text{C}$ 에서 5분간 1회의 조건에서 처리하였으며, 최종 반응액  $5 \mu\text{l}$ 를 DNA 사이즈 스탠더드 마커 (size standard marker)와 함께 2% 아가로스 겔(agarose gel)에 부과하여 전기영동 하였다. 이때 전기영동 겔의 염색은 0.00005% 에티디움 브로마이드(ethidium bromide) 용액으로 행하였으며 겔의 각 경로 상에서 출현한 밴드의 유효 여부는 HPV-16, HPV-18 HPV-31, HPV-43, HPV-2a, HPV-6b, HPV-11, HPV-1a DNA에 대한 각 프라이머의 컴퓨터 가상 증폭실험에서 얻어진 PCR 산물의 예상 크기(하기 표 2)와 비교하여 판정하였다.

<43> 도 1a, 도 1b, 도 1c는 각각 CaSki, HeLa, K-562를 대상으로 본 발명에서 합성된 3조의 프라이머를 사용하여 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진이다. 도면에서 M은 스탠더드 마커이고, 레인 1은 AlbioGP1 프라이머, 레인 2는 AlbioGP2 프라이머, 레인 3은 AlbioGP3 프라이머를 사용한 것을 나타내며, 측면의 숫자는 마커의 크기를 나타낸다. 도면에서 볼 수 있는 바와 같이 본 발명에서 합성된 상기 3조의 프라이머는 HPV 감염 세포주인 Caski(도 1a) 및 HeLa(도 1b)에 대해서는 하기 표 2에서 예측한 크기의 증폭이 일어났으나, 비감염 세포주인 K562(도 1c)에 대해서는 증폭이 일어나지 않았음을 알 수 있다.

<44> 도 2a, 도 2b, 도 2c는 각각 AlbioGP1, AlbioGP2, AlbioGP3 프라이머를 사용하여 여러 가지 HPV 균주를 대상으로 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진이다. 도면 하단의 M은 스탠더드 마커이고, 그 외 숫자는 사용된 HPV 유형을 표시한 것이다. 한편 측면의 숫자는 마커의 크기를 나타낸다. 상기 3조의 프라이머는 도 2a, 도 2b, 도 2c의 모든 레인(AlbioGP-3의 경우 HPV 1a 제외)에서 증폭이 일어난 것을 알 수 있다. 또한, 모든 전기영동 사진의 각 경로에서는 유효 밴드와 구분이 곤란한 어떠한 밴드도 나타나지 않았다. 이는 하기 표 2의 예측결과와 일치하는 것임을 알 수 있다.

<45> 표 2. 선별된 프라이머 증폭산물의 예상크기

| 프라이머     | 증폭 산물의 예상크기(bp) |        |        |        |        |        |        |        |
|----------|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|          | HPV-16          | HPV-18 | HPV-31 | HPV-43 | HPV-2a | HPV-6b | HPV-11 | HPV-1a |
| AlbioGP1 | 323             | 323    | 323    | 323    | 317    | 323    | 323    | 330    |
| AlbioGP2 | 315             | 315    | 314    | 315    | 312    | 315    | 314    | 324    |
| AlbioGP3 | 216             | 218    | 215    | 218    | 210    | 213    | 213    | -*     |

<47> \* : 증폭 산물 없음

<48> 이러한 결과로 볼 때 AlbioGP1, AlbioGP2, AlbioGP3 프라이머는 각각 HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-43, HPV-2a, HPV-6b, HPV-11, HPV-1a DNA에 대한 PCR 증폭 능력이 인정되며 비 선택적 증폭도 나타내지 않은 것으로 판단된다. 따라서 본 결과는 컴퓨터 가상 증폭 실험에서 예견된 AlbioGP1, AlbioGP2, AlbioGP3 프라이머의 선택적 특이 증폭과 모두 일치하였다. 이를 바탕으로 AlbioGP1, AlbioGP2, AlbioGP3 프라이머의 본 PCR 증폭 시험 실시예에서 다루지 못한 많은 HPV 유형에 대한 컴퓨터 가상 증폭 결과(표 2)는 실제 PCR 증폭 실험에서도 충분한 의의가 있을 것으로 전망된다.

<49> 실시예 2 : 임상시료에 대한 선별된 공통 프라이머의 PCR 증폭 시험

<50> 본 실시예에서는 상기 실시예 1에서 확인한 3조의 프라이머를 사용하여 임상적으로 HPV 유형의 DNA의 증폭여부에 따라 HPV 감염 여부는 물론 자궁경부암을 1차적으로 조기 검색할 수 있는지를 확인하였다.

<51> (1) 기존방법에 의한 자궁경부암 진단

<52> 우선 포천중문의과대학 차병원 부인암센터 외래 진료소를 내원한 무작위 30명을 대상으로 PCR 증폭 실험을 수행하였다. 먼저 이를 위해 담당 임상과의 책임 하에 질확대경진(colposcopy) 검사, 자궁경부 촬영진(cervicography) 검사, 조직생검(biopsy), HPV DNA 검사, 세포진 도말(pap-smear) 검사 등의 전문적 검진을 실행하였다. 검진결과 하기 표-4에 제시된 바와 같이 피검자 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 18, 19 및 20은 자궁경부암 환자(cervical cancer), 피검자 6은 자궁경부암의 전구병소인 이형성증 환자(CIS), 피검자 8, 11, 15, 16 및 17은 자궁경부암의 초기 단계인 편평 세포 종양 환자로 비정상적인 환자 (총 20

명)군에 포함되었다. 나머지 피검자는 자궁경부 세포진 도말 검사에서 정상 세포 (피검자 21, 22, 23, 26 및 27) 를 갖거나 근종(myoma) (피검자 24, 28, 29 및 30), 자궁선 근종 (adenomyosis) (피검자 25) 등의 자궁경부암 비관련 환자 (총 10명)군에 포함되었다.

<53> 또한 일부 환자 (피검자 1, 6, 8, 9, 21, 22, 23, 24, 25 및 28)를 대상으로 HPV DNA 검사를 실시한 결과 하이브리드 캡처 II법(hybrid capture II, Digene 사)에서 피검자 1, 6, 8 및 9는 양성이고 피검자 21, 22, 23, 24, 25 및 28은 음성이었으며 DNA 칩(Biomedlab 사)법에 서는 피검자 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 18, 19 및 20에서 양성자 인 것으로 판명되었다. 하기 표 3에서는 상기 진단 결과를 표시하였다.

<54> 표 3. 임상 시험 결과

<55>

| 피검자 No. | 질병        | HPV DNA 진단 검사                   |       |
|---------|-----------|---------------------------------|-------|
|         |           | Hybrid Capture II<br>(High/Low) | DNA 칩 |
| 1       | 자궁경부암     | 양성/음성                           | -*    |
| 2       | 자궁경부암     | -                               | 16    |
| 3       | 자궁경부암     | -                               | 16    |
| 4       | 자궁경부암     | -                               | 16    |
| 5       | 자궁경부암     | -                               | 16    |
| 6       | 자궁경부 이형성증 | 양성/음성                           | -     |
| 7       | 자궁경부암(재발) | -                               | -     |
| 8       | 편평 세포종양   | 양성/음성                           | -     |
| 9       | 자궁경부암     | 양성/음성                           | -     |
| 10      | 자궁경부암     | -                               | 16    |
| 11      | 편평 세포종양   | -                               | 58    |
| 12      | 자궁경부암     | -                               | 16    |
| 13      | 자궁경부암     | -                               | -     |
| 14      | 자궁경부암(재발) | -                               | -     |
| 15      | 편평 세포종양   | -                               | -     |
| 16      | 편평 세포종양   | -                               | -     |
| 17      | 편평 세포종양   | -                               | -     |
| 18      | 자궁경부암     | -                               | 16    |
| 19      | 자궁경부암     | -                               | 58    |
| 20      | 자궁경부암     | -                               | 58    |
| 21      | 정상        | 음성/음성                           | -     |
| 22      | 정상        | 음성/음성                           | -     |
| 23      | 정상        | 음성/음성                           | -     |
| 24      | 자궁 근종     | 음성/음성                           | -     |
| 25      | 자궁선 근종    | 음성/음성                           | -     |
| 26      | 정상        | -                               | -     |
| 27      | 정상        | -                               | -     |
| 28      | 자궁 근종     | 음성/음성                           | -     |
| 29      | 자궁 근종     | -                               | -     |
| 30      | 자궁 근종     | -                               | -     |

<56> \* : 비조사

<57> (2) 선별된 3조의 프라이머에 의한 자궁경부암 진단

<58> 상기 실시예 1에서 확인된 3조의 프라이머와 이미 공개된 HPV 검출 프라이머인

MY09/MY11 프라이머 세트를 사용하여 피검자들로부터 얻은 DNA 샘플을 대상으로 PCR을 수행하고 전기영동을 실시하였다. 피검자들로부터의 DNA는 통상의 방법에 따라 수득하였으며, PCR 반

응 조건은 상기 실시예 1과 동일한 절차에서 수행하였다. 본 발명의 프라이머는 비정상적인 환자(피검자 1 내지 20)로부터 얻은 DNA 샘플에 대해서만 증폭이 일어났으며 정상 환자(피검자 21 내지 30)로부터 얻은 DNA 샘플에 대해서는 증폭이 일어나지 않았다. 이는 자궁경부암 관련 환자 20명과 자궁경부암 비관련 환자 10명의 병인학적 추론과 일치한 것임을 알 수 있다.

<59> 도 3a 내지 도 3t는 본 발명에 따른 3조의 프라이머와 MY09/MY11 프라이머 세트를 사용하여 상기 비정상적인 환자로부터 얻은 DNA 샘플을 대상으로 PCR을 실시하고 전기영동한 사진이다. 도 3a는 피검자 1, 도 3b는 피검자 2, 도 3c는 피검자 3, 도 3d는 피검자 4, 도 3e는 피검자 5, 도 3f는 피검자 6, 도 3g는 피검자 7, 도 3h는 피검자 8, 도 3i는 피검자 9, 도 3j는 피검자 10, 도 3k는 피검자 11, 도 3l은 피검자 12, 도 3m은 피검자 13, 도 3n은 피검자 14, 도 3o는 피검자 15, 3p는 피검자 16, 3q는 피검자 17, 3r은 피검자 18, 3s는 피검자 19, 3t는 피검자 20의 환자로부터 수득한 DNA를 대상으로 한 것이다. 여기에서 M은 스탠더드 마커이고, 레인 1은 AlbioGP1 프라이머, 레인 2는 AlbioGP2 프라이머, 레인 3은 AlbioGP3 프라이머를 나타내며, 레인 4는 비교구로서 MY09/MY11 프라이머를 나타낸다. 또한 각 사진의 좌측면의 숫자는 증폭산물의 크기를 나타낸 것이다. 본 발명의 모든 프라이머에 대해서는 증폭이 일어났으며, 특히 자궁경부암이 재발된 환자(도 3g, 도 3n)로부터 얻은 DNA 샘플에 대해서는 비교구인 MY09/MY11 프라이머 세트로부터 증폭이 일어나지 않음을 알 수 있다.

<60> 도 4a 내지 도 4j는 본 발명에 따른 3조의 프라이머와 MY09/MY11 프라이머 세트를 사용하여 상기 정상적인 환자로부터 얻은 DNA 샘플을 대상으로 PCR을 실시하고 전기영동한 사진이다. 도 4a는 피검자 21, 도 4b는 피검자 22, 도 4c는 피검자 23, 도 4d는 피검자 24, 도 4e는 피검자 25, 도 4f는 피검자 26, 도 4g는 피검자 27, 도 4h는 피검자 28, 도 4i는 피검자 29,



도 4j는 피검자 30의 환자로부터 수득한 DNA를 대상으로 한 것이다. 여기에서 M은 스탠더드 마커이고, 레인 1은 AlbioGP1 프라이머, 레인 2는 AlbioGP2 프라이머, 레인 3은 AlbioGP3 프라이머를 나타내며, 레인 4는 비교구로서 MY09/MY11 프라이머를 나타낸다. 또한 각 사진의 좌측면의 숫자는 증폭산물의 크기를 나타낸 것이다. 본 발명의 프라이머나 MY09/MY11 프라이머 모두 유효한 밴드(AlbioGP1 ; 252 ~ 347, AlbioGP2 ; 306 ~ 339, AlbioGP3 ; 210~242, MY09/MY11 ; 450bp)가 발견되지 않았다.

<61>       이상에서 본 발명의 실시예를 설명하였으나, 이는 예시일뿐, 본 발명의 정신을 벗어나지 않고 다양한 변경과 변형이 가능하다는 것은 당업자에게는 자명할 것이나, 이들은 모두 본 발명의 권리범위에 속한다는 것은 첨부된 청구의 범위를 통해 분명해 질 것이다.

#### 【발명의 효과】

<62>       상기한 것과 같이 본 발명에서 합성된 올리고 뉴클레오티드는 다양한 HPV 유형과 상보적으로 결합하여 상기 HPV 유형을 포괄적으로 증폭할 수 있는 신규한 PCR 공통 프라이머로 사용될 수 있다.

<63>       또한 상기한 프라이머는 직접적으로 다양한 HPV를 검출할 수 있는 프로브로서도 활용될 수 있으며, 상기한 프라이머와 대상 HPV를 PCR을 실시하고 증폭여부를 확인함으로써 HPV 유형의 존부를 검출하는 데 활용할 수 있어 HPV에 의하여 야기되는 자궁경부암 등의 조기 검진에 활용될 수 있다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 뉴클레오티드(제 1프라이머);

서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 뉴클레오티드(제 2프라이머);

서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드(제 3프라이머)로 구성되는 다양한 HPV의 DNA를 증폭하는 합성된 프라이머.

**【청구항 2】**

제 1항에 있어서,

상기 제 1 프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 3, 4, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 16r, 18, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 및 77 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 2 프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 3, 4, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 16r 18, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74 및 77 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 3 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 10, 11, 13, 16, 16r, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 63, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 75, 76 및 77 DNA를 증폭하는 프라이머인 다양한 HPV의 DNA를 증폭하는 합성된 프라이머.

**【청구항 3】**

제 2항에 있어서,

상기 제 1프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 2프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 3프라이머는 HPV 유형 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 DNA를 증폭하는 프라이머이인 다양한 HPV의 DNA를 증폭하는 합성된 프라이머.

**【청구항 4】**

서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 뉴클레오티드(제 1프라이머);

서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 뉴클레오티드(제 2프라이머);

서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드(제 3프라이머)로 구성되는 뉴클레오티드를 프라이머로 사용하고, 생물학적 샘플로부터 얻어진 핵산을 표적 DNA로 하는 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행함으로써 다양한 HPV의 DNA를 증폭하는 방법.

**【청구항 5】**

제 4항에 있어서,

상기 제 1 프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 3, 4, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 16r, 18, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 및 77 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 2 프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 3, 4, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 16r 18, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74 및 77 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 3 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 10, 11, 13, 16, 16r, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 63, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 75, 76 및 77 DNA를 증폭하는 프라이머인 다양한 HPV의 DNA를 증폭하는 방법.

#### 【청구항 6】

제 5항에 있어서,

상기 제 1 프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 2 프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 3 프라이머는 HPV 유형 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 DNA를 증폭하는 프라이머인 다양한 HPV의 DNA를 증폭하는 방법.

## 【청구항 7】

서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 뉴클레오티드(제 1 프라이머);

서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 뉴클레오티드(제 2 프라이머);

서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드(제 3 프라이머)로 구성되는 뉴클레오티드를 프라이머로 사용하고 생물학적 샘플로부터 얻어진 핵산을 표적 DNA로 하여 상기 표적 DNA를 증폭시키는 과정; 및

상기 증폭과정에서 증폭산물이 존재하는 경우 상기 샘플 내에 HPV 유형이 존재하는 것으로 판단하는 과정을 포함하는 다양한 HPV 유형의 존재를 분석하는 방법.

## 【청구항 8】

제 7항에 있어서,

상기 제 1 프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 3, 4, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 16r, 18, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 및 77 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 2 프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 3, 4, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 16r 18, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74 및 77 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 3 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 10, 11, 13, 16, 16r, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 63, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 75, 76 및 77 DNA를 증폭하는 프라이머인 다



양한 HPV 유형의 존재를 분석하는 방법.

【청구항 9】

제 8항에 있어서,

상기 제 1프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 2프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 3프라이머는 HPV 유형 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 DNA를 증폭하는 프라이머인 다양한 HPV 유형의 존재를 분석하는 방법.

【청구항 10】

제 7항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 인간으로부터 수득된 것을 특징으로 하는, 다양한 HPV 유형의 존재를 분석하는 방법.

【청구항 11】

서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 뉴클레오티드(제 1 프라이머);

서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 뉴클레오티드(제 2 프라이머);

83



서열번호 5와 서열번호 6으로 구성되는 뉴클레오티드(제 3 프라이머)로 구성되는 프라이머;

dNTP 혼합물(dATP, dCTP, dGTP, dTTP);

내열성 중합효소; 및

PCR 완충용액을 포함하는 다양한 HPV 유형을 검출하는 키트.

#### 【청구항 12】

제 11항에 있어서,

상기 제 1 프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 3, 4, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 16r, 18, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 및 77 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 2 프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 3, 4, 6b, 7, 10, 11, 13, 16, 16r, 18, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74 및 77 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 3 프라이머는 HPV 유형 2a, 3, 6b, 10, 11, 13, 16, 16r, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 35h, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 63, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 75, 76 및 77 DNA를 증폭하는 프라이머인 다양한 HPV 유형을 검출하는 키트.

【청구항 13】

제 12항에 있어서,

상기 제 1프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

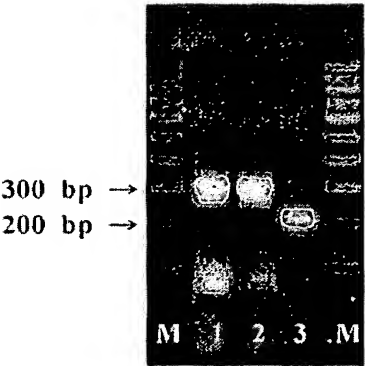
상기 제 2프라이머는 HPV 유형 1a, 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 DNA를 증폭하는 프라이머이고,

상기 제 3프라이머는 HPV 유형 2a, 6b, 11, 16, 18, 31 및 43 DNA를 증폭하는 프라이머인 다양한 HPV 유형을 검출하는 키트.

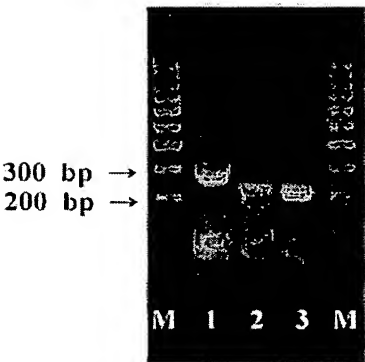


【도면】

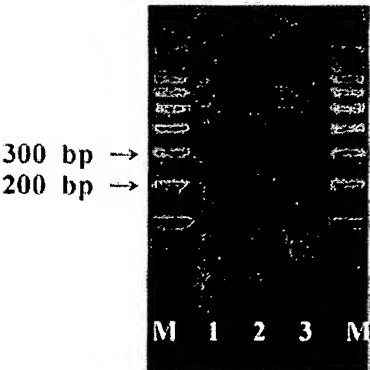
【도 1a】



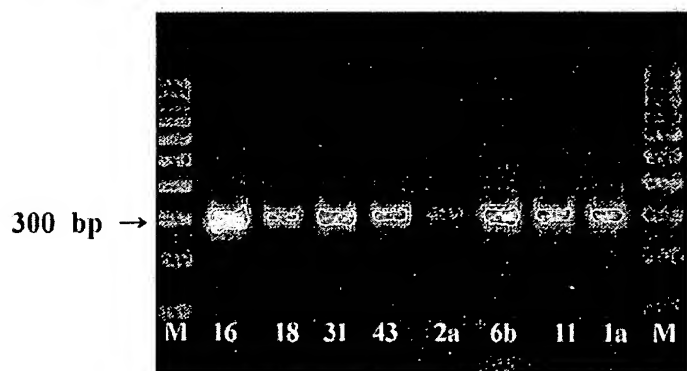
【도 1b】



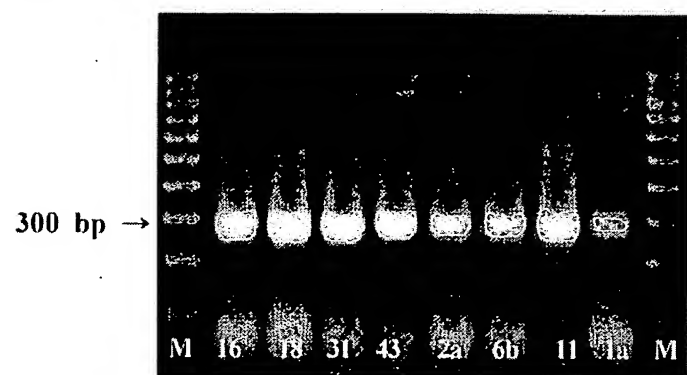
【도 1c】



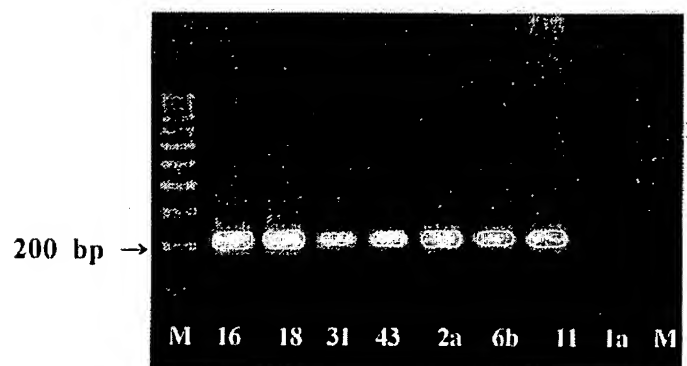
【도 2a】



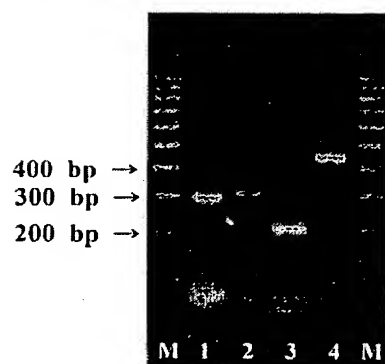
【도 2b】



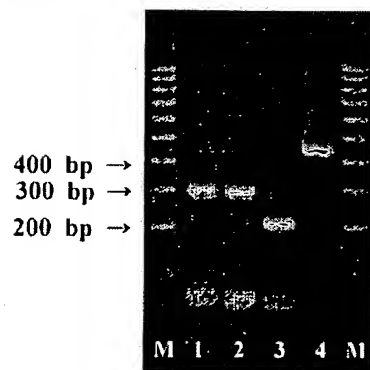
【도 2c】



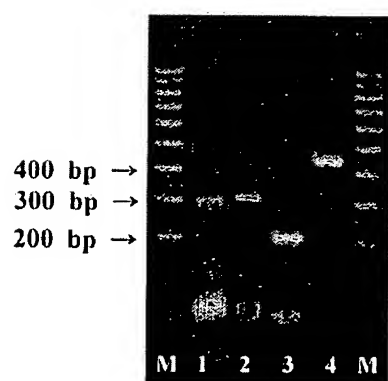
【도 3a】



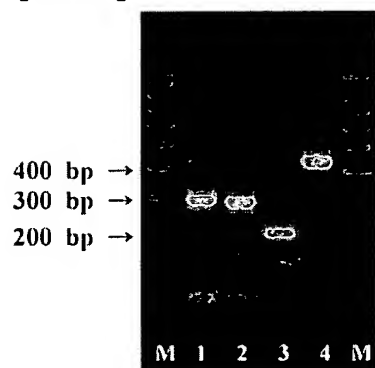
【도 3b】



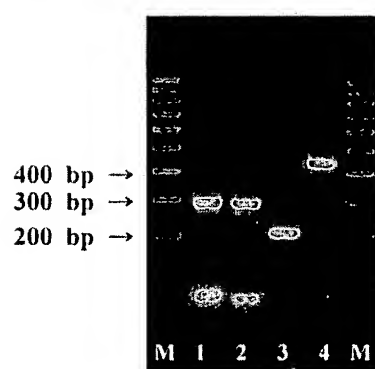
【도 3c】



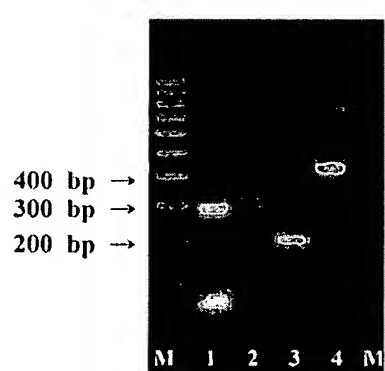
【도 3d】



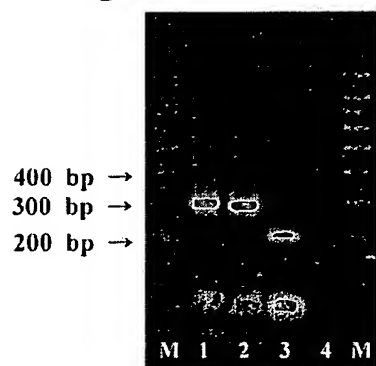
【도 3e】



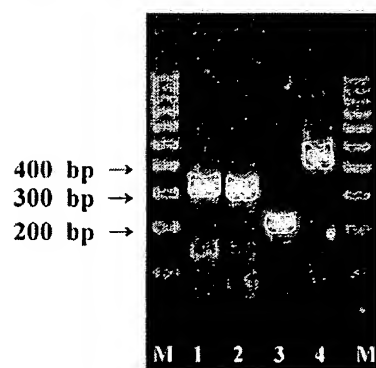
【도 3f】



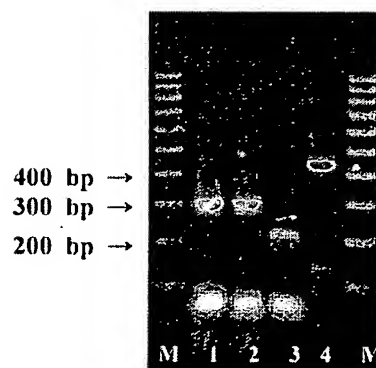
【도 3g】



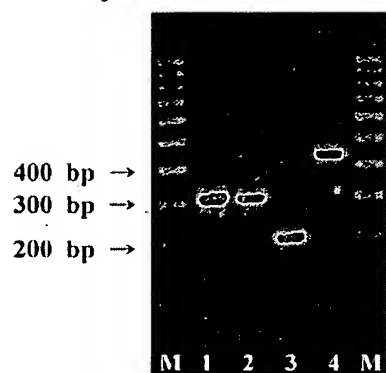
【도 3h】



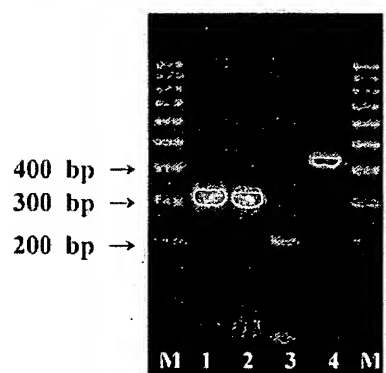
【도 3i】



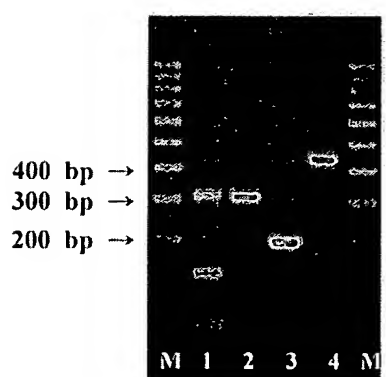
【도 3j】



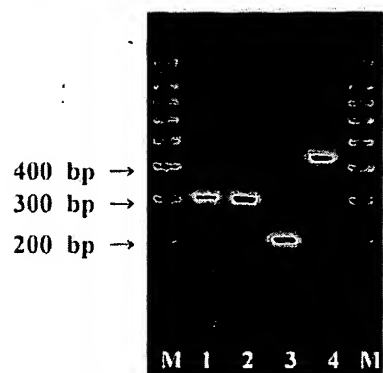
【도 3k】



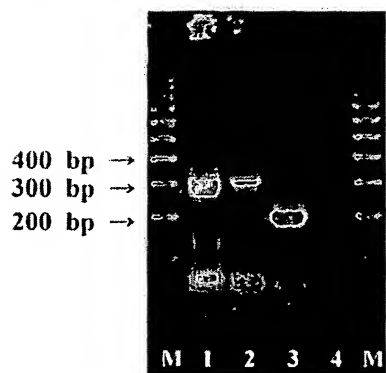
【도 3l】



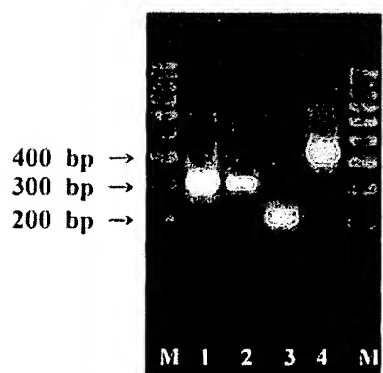
【도 3m】



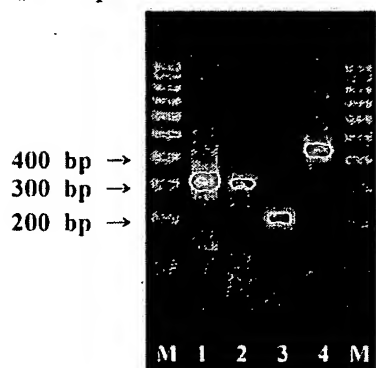
【도 3n】



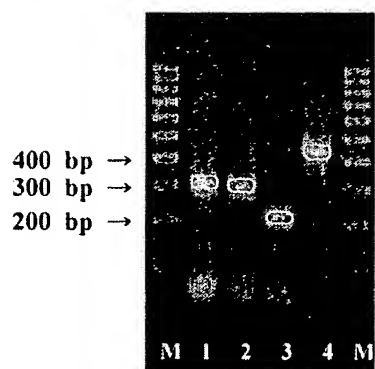
【도 3o】



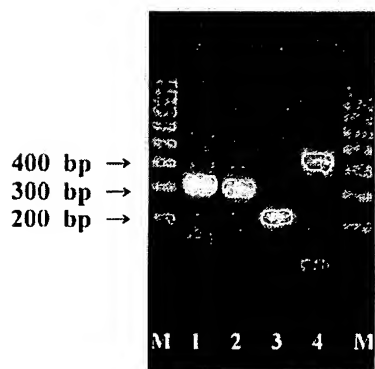
【도 3p】



【도 3q】

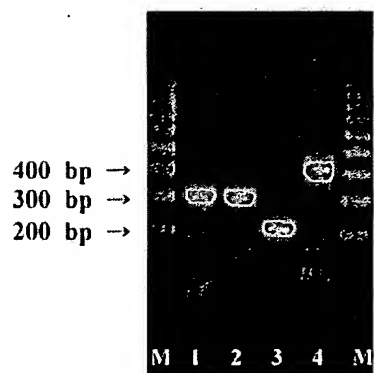


【도 3r】

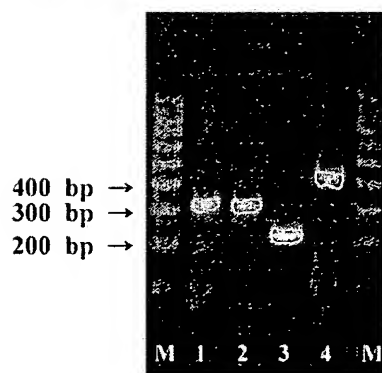




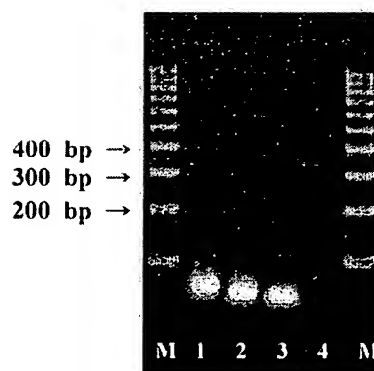
【도 3s】



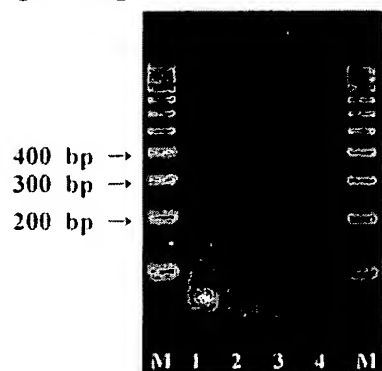
【도 3t】



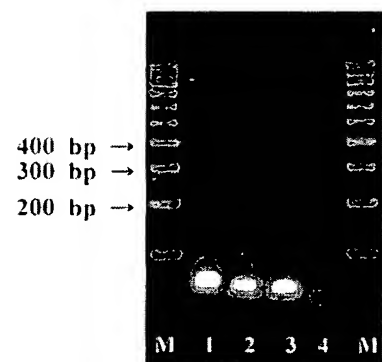
【도 4a】



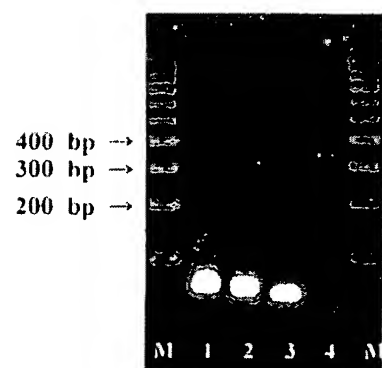
【도 4b】



【도 4c】



【도 4d】

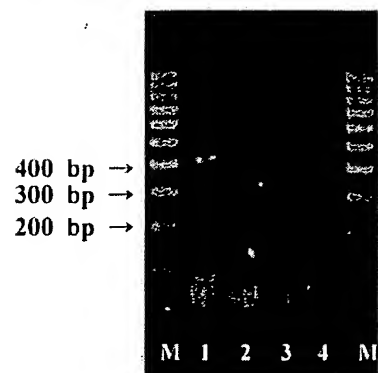




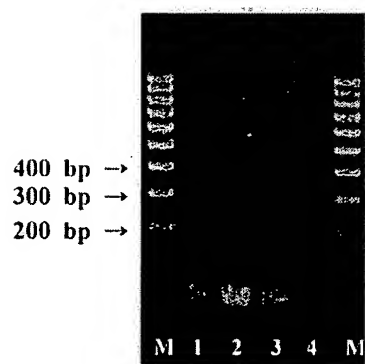
1020020075370

출력 일자: 2003/11/24

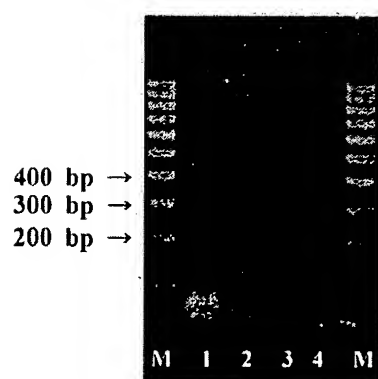
【도 4e】



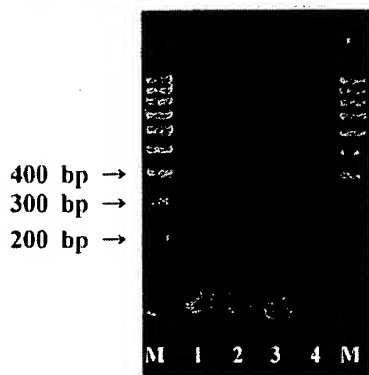
【도 4f】



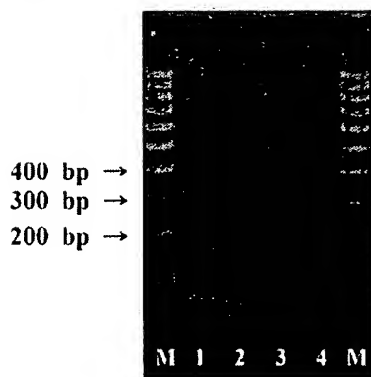
【도 4g】



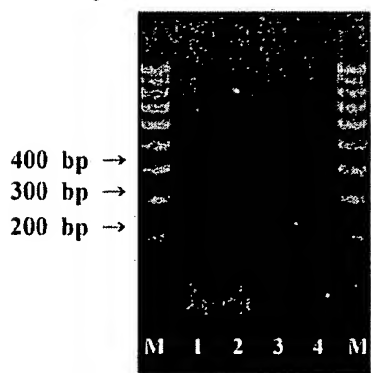
【도 4h】



【도 4i】



【도 4j】



【서열목록】

<110> ALBIOMED Co., LTD <120> Novel PCR General Primers and Method for  
Detecting Various Types of Human Papillomavirus by PCR <160> 6 <170>  
KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence